

张学明,丁海麦,席海燕,等. 重组人 *gdnf* 在人乳腺肿瘤上皮细胞中表达的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):16-19.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.006

重组人 *gdnf* 在人乳腺肿瘤上皮细胞中表达的研究

张学明,丁海麦,席海燕,李 斌,张晶晶,虞 飞

(内蒙古科技大学包头医学院,内蒙古包头 014040)

摘要:为了在人乳腺肿瘤上皮细胞系中表达重组人胶质细胞源性神经营养因子(GDNF),本研究构建了牛 β -casein 基因启动子驱动的人 GDNF 乳腺上皮细胞特异表达载体,用脂质体介导法将其导入人乳腺肿瘤上皮细胞系 Bcap-37 细胞中,经 G418 抗性筛选 8~10 d 后,分离稳定表达红色荧光蛋白的转染细胞,PCR 鉴定转基因细胞,用催乳素、胰岛素及氢化可的松诱导培养转基因细胞,RT-PCR 和 Western Blot 检测重组人 GDNF 的表达分泌。结果表明:重组人 GDNF 乳腺上皮细胞特异表达载体被成功构建,转染 Bcap-37 细胞后,稳定整合到细胞染色体中,转基因细胞经激素诱导后能够表达分泌糖基化的 GDNF,为高效制备与天然人 GDNF 蛋白结构完全一致的重组人 GDNF 蛋白用于帕金森病临床治疗研究奠定了基础。

关键词:人乳腺肿瘤上皮细胞系;生物反应器;胶质细胞源性神经营养因子;表达载体;帕金森病

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0016-04

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是老年人群中常见的一种神经元退行性疾病,其临床表现主要是以静止性震颤、运动迟缓、肌僵直和姿势平衡障碍为特征。PD 的病理特征主要是中脑黑质多巴胺能神经元退行性丧失,导致纹状体中多巴胺含量显著降低^[1]。目前用于 PD 临床治疗的常规药物主要有复方左旋多巴、多巴胺受体激动剂、抗胆碱能药物等,这些药物能够暂时减轻或缓解症状,但不能阻止 PD 的进程,且长期用于 PD 治疗会出现多种并发症^[2];因而,研制开发新的药物用于 PD 的有效治疗是非常必要的。

胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是由 Lin 等于 1993 年在 B49 神经胶质瘤细胞中分离纯化出的一种分泌性糖蛋白,属于 TGF- β 超家族成员^[3]。研究表明,GDNF 对多巴胺能神经元具有营养及保护作用^[4],应用 GDNF 治疗帕金森病已进入二期临床研究^[5]。然而由于 GDNF 在人和动物体中含量低,从动物组织中分离纯化 GDNF 用于疾病动物模型和临床实验研究是不现实的;因而,应用转基因技术大量生产重组 GDNF 用于疾病动物模型和临床研究具有潜在的重大社会效益和经济效益。

本研究构建了牛 β -casein 基因启动子驱动的人 GDNF 基因乳腺上皮细胞高效特异表达载体,转染人乳腺肿瘤上皮细胞系 Bcap-37 细胞,获得了能够表达重组人 GDNF 蛋白的转基因 Bcap-37 细胞系,为高效制备与天然人 GDNF 蛋白结构完全一致的重组人 GDNF 蛋白,并将其用于帕金森病临床治疗的研究奠定基础。

收稿日期:2014-07-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060304);内蒙古高等学校科学研究项目(编号:NJ10184)。

作者简介:张学明(1970—),男,内蒙古包头人,博士,副教授,主要研究方向为重组药物蛋白。E-mail:byzhxm@126.com。

[18]高梅秀. 不同整形和密度对桃树生长和结果的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(z1):47-49.

[19]王安柱. 主干形桃树对光截获能力和果实产量品质的影响[J]. 北方果树,2009,26(5):55.

[20]朱秀珍,余厚敏,丁士林. 树冠光照分布对砂子早生桃果实产量及品质的影响[J]. 安徽农学院学报,1987,14(4):49-54.

[21]何凤梨,王 飞,魏钦平,等. 桃树冠层相对光照分布与果实产量品质关系的研究[J]. 中国农业科学,2008,41(2):502-507.

[22]李绍华,刘国杰,杜宗绪,等. 不同冬季修剪方法对桃树果实生长、产量及品质的影响[J]. 果树科学,1997,14(2):91-95.

[23]宋宏峰,殷守防,马瑞娟. 长枝修剪对桃树生长和果实品质的影响[J]. 江西农业学报,2011,23(10):79-80.

[24]杜宗绪,李绍华,张 洪,等. 长枝修剪对桃树生育状况的影响[J]. 北方果树,1997(3):15-17.

[25]胡汉升,范宏伟,王荣献. 密植桃树长枝修剪技术研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报,1999,9(1):27-29.

[26]李绍华,张学兵,孟昭清,等. 桃树长枝修剪技术研究[J]. 中国

果树,1994(4):19-22.

[27]顾 红,方金豹,陈锦永,等. 长枝修剪对早熟油桃生长及果实品质的影响[J]. 河南农业科学,2009,38(1):85-87.

[28]钟秋珍,黄新忠,英雄峰,等. 台湾脆桃不同类型果枝对产量、果实品质的影响[J]. 天津农业科学,2007,13(3):15-17.

[29]陈海江,段红喜,徐继忠,等. 提高设施桃果实品质试验[J]. 山西果树,2003(1):4-5.

[30]王百千,杨丽娟. 冬季长枝修剪对桃树花芽质量的影响[J]. 河北果树,2012(3):9-9.

[31]席万鹏,王泽浩,亚合甫·木沙,等. 不同摘心处理对密植蟠桃生长和结果的影响[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2007,25(4):432-434.

[32]李文光. 与果实品质相关的农业技术因素[J]. 河北农业技术师范学院学报,1988,2(1):28-34.

[33]徐义流,陆丽娟,高正辉. 长枝修剪对 NJC19 黄桃树体生长及果实品质的影响[J]. 中国农学通报,2009,25(12):185-187.

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 DH5 α 、pP40R、pCMV-Red、pUC-gdnf 为内蒙古科技大学包头医学院医学生物化学实验室保存。

质粒提取试剂盒 (QIAGEN 公司)、小量 RNA 提取试剂盒 (上海舜华生物工程有限公司)、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TIANGEN 公司)、DNA 纯化试剂盒 (TIANGEN 公司)。

Taq Plus、Pfu DNA 聚合酶购自 TIANGEN 公司;T₄ DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、M-MLV 反转录酶、Oligo(dt)、限制性内切酶均为 TaKaRa 产品。

人乳腺肿瘤上皮细胞系 Bcap-37 购自中国科学院上海细胞研究所;RPMI-1640、催乳素、氢化可的松、胰岛素购自 Sigma 公司;兔抗人多克隆 GDNF 抗体 (Rabbit Polyclonal GDNF Antibody) 购自 Santa Cruz 公司;连接了碱性磷酸酶的羊抗兔二抗 (Goat Anti-rabbit Second Antibody Conjugated with Alkaline Phosphatase) 及 BCIP/NBT 试剂盒购自博士德公司。

1.2 试验方法

1.2.1 重组人 gdnf 乳腺特异表达载体的构建 根据 Bonsing 等发表的牛 β -casein 基因序列 (M5188)^[6] 设计 PCR 上游引物: 5'-TCTGGGCCCCGAAAAGGGAATGTTGAATGGGAAG-3', 下游引物: 5'-GGCTCGAGCTCTCTGGGAATGGGAAGATGA-3', 上下游引物两端分别引入 Apa I 和 Xho I 酶切位点。提取牛基因组 DNA, PCR 扩增牛 β -casein 基因 5' 端上游包括启动子、第 1 外显子、第 1 内含子及部分第 2 外显子的 3.6 kb 调控序列, 经 Apa I/Xho I 双酶切后插入到骨架载体 pP40R^[7] 的 Apa I/Xho I 双酶切位点作为 gdnf cDNA 乳腺特异表达的调控序列。Xho I 酶切质粒 pUC-gdnf 获得人 gdnf cDNA 基因插入到牛 β -casein 基因 5' 端 3.6 kb 调控序列下游的 Xho I 位点。PCR 检测 gdnf cDNA 的插入方向, PCR 上游引物设计在载体 3.6 kb 调控序列上, 引物序列为 5'-ACTATTCCTCATCTTCCCATTCCCAG-3', 下游引物设计在 gdnf cDNA 序列上, 引物序列为 5'-GAGCTCCAGTCAGATACATCCACACCTTTTAG-3'; 反应条件: 94 °C 变性 45 s, 62 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环。正向插入将获得 598 bp 的特异产物, 反向插入则无特异性 PCR 产物。载体构建完成后, 对载体与片段连接处、牛 β -casein 基因 5' 端调控序列核心区域进行测序。

1.2.2 Bcap-37 细胞的稳定转染与筛选 用含 20% 胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) 的 RPMI-1640 培养液, 于 37 °C、5% 浓度、饱和湿度条件下培养 B-cap37 细胞至 70%~80% 汇合时, 消化细胞, 以 3×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板。24 h 后, 按照脂质体 Lipofectamine 操作说明, 每孔加入 2.0 μ g 线性化载体 DNA 转染细胞。48 h 后, 消化每孔细胞接种于 100 mm 培养皿中, 并加入浓度为 300 μ g/mL 的 G418 筛选 8~10 d 后, 将表达红色荧光蛋白的细胞克隆分离、扩培、冷冻保存备用。

1.2.3 PCR 检测稳定转染细胞 提取稳定转染细胞基因组 DNA, PCR 检测 gdnf cDNA 是否整合到细胞基因组 DNA 中。PCR 上游引物: 5'-GACCTCGAGATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTC-3', 下游引物: 5'-GAGCTCGAGTCAGAT-

ACATCCACACCTTTTAG-3'; 反应条件为: 94 °C 变性 45 s, 58 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环。

1.2.4 转基因细胞的诱导表达 阳性转基因细胞生长至 80% 汇合时, 更换诱导培养基 (RPMI-1640 + 4 μ g/mL 催乳素 + 10 μ g/mL 胰岛素 + 1 μ g/mL 氢化可的松), 分别诱导培养 24、48 h 后, 收集细胞及细胞培养上清液。

1.2.5 RT-PCR 分析 gdnf 的表达 诱导培养的细胞按照 RNA 提取试剂盒操作说明提取 RNA, 以 1.0 μ g RNA 为模板反转录合成 cDNA 第 1 链。以 cDNA 为模板 PCR 检测转基因细胞诱导培养后是否有 gdnf 在 mRNA 水平的表达。PCR 引物、反应条件同“1.2.3”节。

1.2.6 Western Blot 检测 gdnf 的表达 三氯乙酸法浓缩细胞诱导培养上清液, Lorry 法测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封膜, 一抗 4 °C 过夜杂交, 二抗室温孵育 1 h, BCIP/NBT 显色。

2 结果与分析

2.1 重组人 gdnf 乳腺特异表达载体的鉴定

载体物理图谱见图 1, PCR 检测目的基因 gdnf 的插入方向见图 2。酶切鉴定 gdnf 插入方向正确的载体, 用 Apa I 单酶切载体后, 线性载体大小与预期大小 (11 507 bp) 相符; 用 Xho I 酶切载体能够获得预期的 576 bp 的目的基因 gdnf 片段; 用 Apa I/Xho I 双酶切载体能够获得预期的 3.6 kb 调控序列片段和 576 bp 目的基因 gdnf 片段 (图 3)。载体与片段连接处、牛 β -casein 基因 5' 端调控序列核心区域的测序结果正确 (数据未显示)。结果表明, 本研究成功构建了以 neo 基因和 DsRed2 作为双筛选因子、牛 β -casein 基因 5' 端调控序列驱动的重组人 gdnf 乳腺特异表达载体。

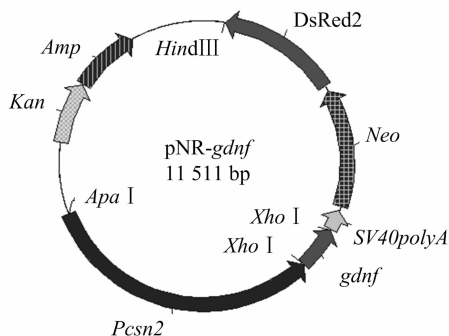
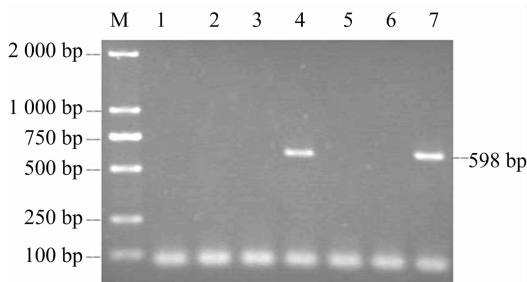
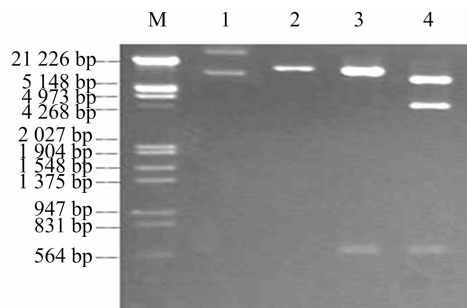


图1 pNR-gdnf 载体图谱



M—DNA 分子量标准 DL 2000; 1—阴性对照 (双蒸水); 2~7—重组质粒

图2 重组质粒 PCR 检测 gdnf 的插入方向

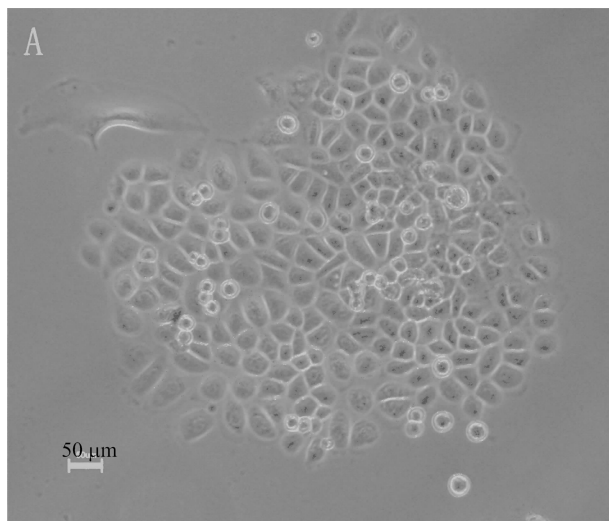


M— λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I; 1—重组质粒 pNR-*gdnf*;
2—pNR-*gdnf*/*Apa* I; 3—pNR-*gdnf*/*Xho* I;
4—pNR-GDNF/*Apa* I/*Xho* I

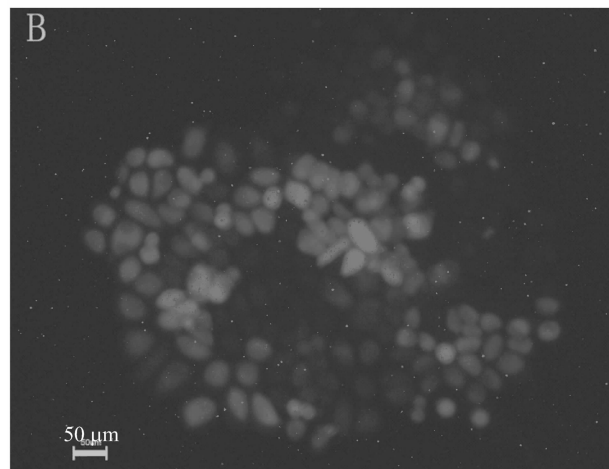
图3 重组质粒 pNR-*gdnf* 的酶切鉴定结果

2.2 转基因细胞的鉴定

线性化载体转染 B-cap37 细胞, G418 筛选 8~10 d 后, 获得了表达红色荧光蛋白的细胞克隆(图 4)。分离扩增红色荧光细胞, 提取基因组 DNA, PCR 扩增重组人 *gdnf*, 发现未转染细胞无特异条带, 而稳定转染的红荧光细胞获得了与预期一致的特异条带(图 5), 表明重组人 *gdnf* 已整合到细胞基因组之中。

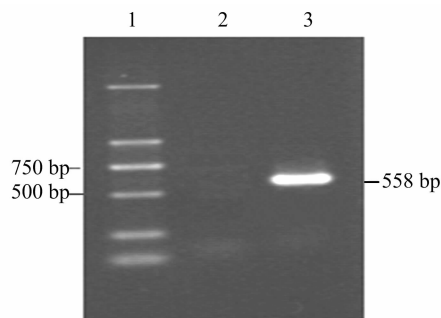


A. 相差显微镜(200×)



B. 荧光显微镜(200×)

图4 G418 抗性克隆显微观察

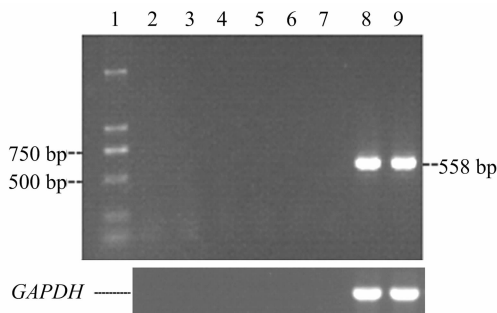


1—DNA 分子量标准 DL2000; 2—Bcap-37 细胞阴性对照;
3—转基因 Bcap-37 细胞

图5 PCR 检测转基因细胞

2.3 *gdnf* 基因的诱导表达

2.3.1 RT-PCR 检测 阳性转基因细胞及未转染细胞诱导培养 24、48 h 后提取 RNA, 以 RNA 为模板 PCR 扩增 *gdnf* cDNA, 无特异条带产生, 表明 RNA 未受基因组 DNA 污染; 以 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第 1 链, PCR 扩增 *gdnf* cDNA 基因, 诱导培养 24、48 h 的转基因细胞获得了 558 bp 特异条带, 而阴性对照无特异条带产生(图 6)。结果表明牛 β -casein 基因启动子能够驱动 *gdnf* cDNA 基因转录为 mRNA。



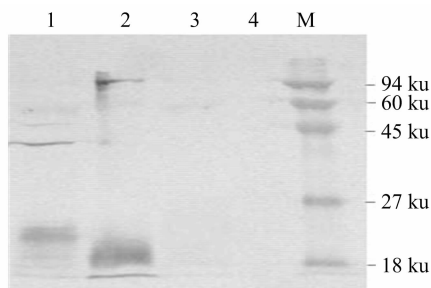
1—DNA 分子量标准 DL2000; 2、3—以诱导培养 24、48 h 非转基因细胞总 RNA 为模板的 RT-PCR 结果; 4、5—以诱导培养 24、48 h 转基因细胞总 RNA 为模板的 RT-PCR 结果; 6、7—诱导培养 24、48 h 非转基因细胞的 RT-PCR 结果; 8、9—诱导培养 24、48 h 转基因细胞的 RT-PCR 结果

图6 RT-PCR 分析转基因 Bcap-37 细胞重组人 *gdnf* 的转录

2.3.2 Western Blot 检测 诱导培养 48 h 的转基因细胞上清液经 Western Blot 探测, 有大约 15、18 ku 的 2 条特异带形成, 而未转染细胞无特异带形成(图 7), 表明 *gdnf* cDNA 基因能够翻译成蛋白, 而且能进行翻译后加工形成糖蛋白分泌到细胞外。

3 结论与讨论

当前, 用于疾病动物模型和临床研究的重组人 GDNF 是用转基因大肠杆菌发酵制备的^[8]。用大肠杆菌生产的重组人 GDNF 不能被糖基化^[8]。临床研究表明, 糖基虽然对 GDNF 的神经营养功能不是必要的, 但在帕金森病 II 期临床研究中, 约有 10% 的病人由于重组人 GDNF 缺乏糖基化而产生了抗 GDNF 抗体的免疫反应^[9]; 因而, 利用大肠杆菌生产重组蛋白虽然快速经济, 但该表达系统由于缺乏翻译后修饰功能, 而不适用于需要进行翻译后修饰的重组蛋白的生产。而且, 已有研究表明利用大肠杆菌生产的重组人 GDNF 由于蛋



M—蛋白质分子量; 1、2—诱导培养 24、48 h 的转基因 Bcap-37 细胞上清液; 3、4—诱导培养 24、48 h 的非转基因 Bcap-37 细胞上清液

图7 Western Blot 检测重组GDNF蛋白的分泌

白质的错误折叠而影响了其生物学功能^[10]。也有研究者用昆虫细胞和酵母菌制备重组人 GDNF, 这些低等真核细胞虽然可以表达糖基化的重组人 GDNF, 但其糖基化与天然的人 GDNF 的糖基化有差异^[11-13], 从而在临床研究中同样存在安全问题。

当前, 需要进行翻译后修饰的重组蛋白大多用非人类的哺乳动物细胞进行表达^[14]。用非人类的哺乳动物细胞可以表达与天然人蛋白结构一致的重组人蛋白, 但也有时候存在差异^[15]; 因而在治疗应用上, 人们更希望利用人细胞系来生产与天然人蛋白结构完全一致的重组人蛋白^[16]。

本研究将人 *gdnf* cDNA 插入到 3.6 kb 牛 β -casein 基因 5'端调控序列下游, 并用 SV40 polyA 序列作为其转录终止信号, 构建了重组人 *gdnf* 乳腺特异表达载体。将其转入人乳腺肿瘤细胞系 Bcap-37 中, 获得了随机整合转基因细胞, 用激素诱导表达后在细胞上清液中检测到了重组人 GDNF 蛋白。人 GDNF 蛋白为同源二聚体糖蛋白, 单体糖蛋白 18 ku, 去糖基化单体约 15 ku^[17]。本研究从激素诱导的转基因细胞上清液中通过 Western Blot 探测到约 15、18 ku 的 2 条特异条带, 且重组人 GDNF 蛋白绝大部分为糖基化蛋白(图 7)。由于该重组蛋白是用入乳腺肿瘤细胞系作为反应器制备的, 因而, 我们推测在人乳腺肿瘤细胞系 Bcap-37 中表达的 18 ku 重组人 GDNF 蛋白与天然的人 GDNF 相比, 在结构上应当没有差异, 如果用于临床研究应当更具有安全性。本研究为高效制备与天然人 GDNF 蛋白结构完全一致的重组人 GDNF 蛋白用于帕金森病临床治疗研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.
- [2] 谢瑞满. 帕金森病研究进展[J]. *现代实用医学*, 2003, 15(7): 401-404.
- [3] Lin F L, Doherty D H, Lile J D, et al. GDNF: a glial cell line -

- derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [4] Tomac A, Lindqvist E, Lin, F L, et al. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in vivo* [J]. *Nature*, 1995, 373(6512): 335-339.
- [5] Slevin J T, Gerhardt G A, Smith C D, et al. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line - derived neurotrophic factor [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2005, 102(2): 216-222.
- [6] Bonsing J, Ring J M, Stewart A F, et al. Complete nucleotide sequence of the bovine β -casein gene [J]. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1988, 41(4): 527-537.
- [7] 张学明, 罗奋华, 苏慧敏, 等. 人 *gdnf* 基因的克隆及牛 β -酪蛋白基因座定位整合载体的构建 [J]. *生物技术通报*, 2009(5): 113-118.
- [8] Slevin J T, Gash D M, Smith C D, et al. Unilateral intraputamenal glial cell line - derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2007, 106(4): 614-620.
- [9] Lang A E, Gill S, Patel N K, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line - derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease [J]. *Annals of Neurology*, 2006, 59(3): 459-466.
- [10] 陈哲宇, 何志勇, 何成, 等. 人 GDNF 结构与功能关系 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(3): 243-247.
- [11] 陈哲宇, 黄爱军, 何成, 等. 人 GDNF 在甲醇酵母及家蚕幼虫中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 561-565.
- [12] Jarvis D L, Kowar Z S, Hollister J R. Engineering *N*-glycosylation pathways in the baculovirus - insect cell system [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(5): 528-533.
- [13] Wildt S, Gerngross T U. The humanization of *N*-glycosylation pathways in yeast [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(2): 119-128.
- [14] Chu L, Robinson D K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(2): 180-187.
- [15] Böszö Z, Baranyi M, Whitelaw C B. Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 357-393.
- [16] Lee S B, Park J S, Lee S, et al. Overproduction of recombinant human VEGF (vascular endothelial growth factor) in Chinese hamster ovary cells [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18(1): 183-187.
- [17] Grimm L, Holinski - Feder E, Teodoridis J, et al. Analysis of the human *GDNF* gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products [J]. *Human Molecular Genetics*, 1998, 7(12): 1873-1886.